



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

GUSTAVO FILIPE WONG CHIU

LUIZA SILVEIRA LABORÃO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PÃES DE
FORMA INTEGRAIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO RIO
DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

- 2011 -

GUSTAVO FILIPE WONG CHIU

LUIZA SILVEIRA LABORÃO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PÃES DE
FORMA INTEGRAIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO RIO
DE JANEIRO**

Projeto Final de Curso apresentado à
Escola de Química como pré-requisito
para obtenção do grau de Engenheiro
de Alimentos

ORIENTADORA: Prof^ª. Karen Signori Pereira

Rio de Janeiro

- 2011 -

DEDICATÓRIA (GUSTAVO)

Dedico ao meu avô.

AGRADECIMENTOS (GUSTAVO)

A minha mãe, Margaret, pela paciência, cobranças, apoio e por nunca ter me deixado desistir;

A minha irmã, pela amizade e companheirismo;

As minhas tias, Helanda e Ivone, pelo apoio, carinho e compreensão;

A minha tia Valéria, por sempre acreditar em mim;

A minha orientadora Prf^a. Dra. Karen Sinori Pereira, pela paciência, orientação e pelos doces;

Aos meus amigos Diego, Lucas, Marcio, Rodrigo e Thiago, pela amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração.

DEDICATÓRIA (LUIZA)

Dedico aos meus pais.

AGRADECIMENTOS (LUIZA)

Aos meus pais, Luiz Carlos e Jane, pelo apoio e carinho;

A minha madrinha, Junia, por ser minha segunda mãe;

A minha amiga Domingas, por estar sempre presente;

A minha orientadora Prf^a. Dra. Karen Sinori Pereira, pelo incentivo e orientação.

RESUMO

Os alimentos saudáveis demonstram uma forte tendência de consumo, devido à necessidade de uma alimentação balanceada. Assim, pães integrais surgiram com o intuito de auxiliar numa dieta equilibrada, fornecendo carboidratos, proteínas, fibras, e tudo aliado a baixo teor de calorias e gorduras. Para verificação da qualidade microbiológica de pães integrais, foram coletadas amostras obtidas nos supermercados da cidade do Rio de Janeiro, e realizadas as seguintes análises: *Salmonella* spp., Coliformes, *E. coli* e contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais. Foram avaliadas amostras pertencentes a três diferentes marcas, compondo um total de 45 unidades amostrais analisadas microbiologicamente. Como resultado, todas as amostras encontravam-se dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ou seja, ausência para *Salmonella* spp., e contagens de coliformes termotolerantes inferiores a 10^2 UFC/g.

Palavras-Chave: Pão Integral, Coliformes, *E. coli*, Fungos, *Salmonella* spp.

SUMÁRIO

1.....	INTRODUÇÃO	1
2.....	OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....		4
3.1 O que é pão?.....		4
3.2 Qualidade Microbiológica e Segurança de Alimentos.....		8
3.2.1 <i>Salmonella spp.</i>		9
3.2.2 Coliformes Totais, Coliformes		
.....Termotolerantes e <i>Escherichia Coli</i>		12
3.2.3 Fungos.....		13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....		16
4.1 Análise de Coliformes e <i>Escherichia Coli</i>		16
4.2 Análise de <i>Salmonella spp.</i>		17
4.3 Análise de Fungos Filamentosos e Leveduras e		
Contagem de Aeróbios Mesófilos Totais.....		18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		19
6. CONCLUSÃO.....		26
7. REFERÊNCIAS.....		27
8. ANEXOS E APÊNDICES.....		33

1 INTRODUÇÃO

O perfil do consumidor vem mudando ao longo dos anos juntamente com as novas tendências e tecnologias aplicadas na indústria. A crescente preocupação com a saúde fez com que características como sabor e frescor, que tradicionalmente direcionavam a escolha do alimento, pesassem da mesma forma que funcionalidade e salubridade. Segundo a Conferência Nacional de Segurança Alimentar, realizada em Brasília em 1994, a segurança alimentar significa garantir, a todos, condições de acesso a alimentos básicos de qualidade, em quantidade suficiente, de modo permanente e sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo, assim, para uma existência digna, em um contexto de desenvolvimento integral do ser humano (MACEDO, 2009).

Atualmente, tanto a obesidade quanto a desnutrição são tratadas como epidemias. Em um mundo com distúrbios alimentares tão graves, os cereais desempenham um papel importante em uma alimentação balanceada uma vez que suprem necessidades diárias de energia e de crescimento. No caso de pães integrais, somam-se às vantagens a simplicidade de preparo, paladar agradável, facilidade de transporte, preço acessível e benefícios a saúde.

A busca por produtos de base integral cresceu a partir de 1999, após a seguinte declaração da *Food and Drug Administration* (FDA): “Dietas ricas em alimentos elaborados com grãos integrais e outros vegetais, associadas com baixa ingestão de gorduras totais, saturadas e colesterol podem reduzir o risco de doenças cardíacas e alguns tipos de câncer”. Haas, Antone e de Francisco (2007) defendem que 80 a 90 % dos casos de câncer estão associados a fatores ambientais; o consumo de grãos integrais pode evitar o desenvolvimento do câncer colo retal na medida em que diminuem o tempo do trânsito intestinal e também devido as fibras presentes nos grãos se ligarem a ácido biliares, reduzindo a absorção de lipídios.

O caráter integral dos pães se dá devido à presença da farinha integral, em substituição da comum, e/ou grãos integrais. Se por um lado a presença destes adicionam atributos aos alimentos, por outro tornam o controle microbiológico mais complexo. A superfície externa dos grãos contém desde

alguns milhares a vários milhões de microrganismos contaminantes provenientes do solo, insetos, fertilizantes, fezes de animais e de outras fontes. Apesar das condições para desenvolvimento de microrganismos em grãos serem restritas devido à baixa atividade de água, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da RDC 12/01 torna obrigatória a análise de *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes em pães de forma.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as condições microbiológicas de três (3) diferentes marcas de “pães de forma tipo integral” que contivessem pelo menos “7 grãos”, ou mais, em sua formulação, baseando-se nos parâmetros exigidos pela RDC 12/01 da ANVISA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O QUE É PÃO?

O pão é um alimento resultante de uma massa feita com farinha de certos cereais, principalmente, trigo, água e sal; e conseqüente cozimento dessa massa. Antes do processo de cozimento, grande parte dos pães passa por um processo de fermentação, em geral por leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*,

De acordo com Kaisermann (2009), a origem do pão é incerta uma vez que este está presente há muito tempo na vida do homem e em diversas culturas. Antropólogos e historiadores estimam que o primeiro pão apareceu por volta de 12 mil ano atrás, acompanhando o cultivo do trigo. Como naquela época as técnicas utilizadas pelo homem para caça, armazenamento e preparo de alimentos eram rudimentares, acredita-se que o trigo era mastigado, ou seja, pouco triturado; seu processamento foi evoluindo com a humanidade. Os primeiros pães eram bem diferentes do que conhecemos hoje em dia. Eram achatados, duros e secos e não podiam ser comidos após cozidos. Deviam ser lavados e expostos para retirada do amargor. O pão chegou à Europa por volta de 250 a. C., resultado de trocas comerciais entre gregos e egípcios. No Brasil, a atividade de panificação só se expandiu no início do século XX, após a chegada dos imigrantes italianos, apesar da farinha de mandioca e do pão de trigo já serem conhecidos após a chegada dos portugueses.

Algumas características de pães como elasticidade e viscosidade da massa, dependem diretamente da quantidade dos dois tipos de proteínas (solúveis e insolúveis em água) existentes na farinha utilizada (COULTATE, 2004). As características da farinha dependem, conseqüentemente, do tipo de grão/cereal utilizado para sua fabricação.

Os grãos dos cereais possuem muitas características em comum. Sua estrutura é dividida da seguinte forma: (i) o embrião ou germe da nova planta, (ii) o endosperma (aproximadamente 80% o grão), reserva de nutriente para a planta e (iii) as camadas protetoras da película da semente, ou mais conhecida como o farelo (COULTATE, 2004). Genericamente, a farinha resultante da

moagem de grãos contendo suas “cascas” (o farelo) recebe o nome de farinha integral.

Segundo a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº263, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA, pão é o produto obtido “da farinha de trigo e ou outras farinhas, adicionados de líquido, resultantes do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem os produtos. Podem apresentar cobertura, recheio, formato e textura diversos” (BRASIL, 2005a). De acordo com a Instrução Normativa nº 8, de 2005, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), farinha de trigo integral é o produto elaborado com grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) ou outras espécies de trigo do gênero *Triticum*, ou combinações por meio de trituração ou moagem e outras tecnologias ou processos a partir do processamento completo do grão limpo, contendo ou não o gérmen. (BRASIL, 2005b). Já o farelo, é produto resultante do processamento de grãos de cereais e ou leguminosas, constituídos principalmente de casca e ou gérmen, podendo conter partes do endosperma (BRASIL, 2005a).

No que diz respeito à regulamentação de pães, e outros produtos de panificação como biscoitos e bolos, integrais, não há regulamentação no país estabelecendo percentuais mínimos de farinha de trigo integral, farelo de trigo e/ou fibra de trigo para que tais produtos possam ser caracterizados como “integrais”. Diante da ausência de parâmetros para o setor, o Ministério Público abriu inquérito para investigar os percentuais de ingredientes integrais nos pães industrializados. Quer um acordo com as empresas para que divulguem, no mínimo, a quantidade de grãos integrais adicionada ao produto. Nos Estados Unidos, por exemplo, o produto precisa ter pelo menos 51% de grãos integrais para poder se autodenominar “integral”. (LEITE, 2010).

Em 2010, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria (ABIP), o faturamento anual do segmento de panificação foi de R\$ 56,3 bilhões, o índice de crescimento estimado foi de 13,7% comparando-se ao ano de 2009. Outro aspecto de destaque no setor diz respeito aos empregos gerados. Também em 2010, houve um aumento de

3,40% no número de postos gerados, ou seja, 25 mil funcionários contratados pelas padarias neste ano. Assim, o setor gera cerca de 758 mil empregos diretos e 1,8 milhão de forma indireta. Contudo, ainda se percebe uma defasagem de cerca de 25 mil postos no setor, donde se conclui que este número poderia ser maior, caso houvesse maior investimento em qualificação de mão-de-obra (ABIP, 2011).

Em 2009, a categoria pães integrais correspondia a 5,3% do mercado e havia crescido 10,2% em número de unidades vendidas - acima dos 8,4% registrados por toda a categoria de pães e bolos (LEITE, 2010).

Segundo a ABIP, em 2001 os brasileiros consumiram cerca de 4,7 milhões de toneladas de pães, correspondendo a um consumo médio de 27 kg/hab/ano. Este número não corresponde à metade do consumo recomendado pela Organização Mundial de Saúde: 60kg/hab/ano (CAFÉ et al., 2003).

A figura a seguir (FIGURA 1) representa esquematicamente o processo de fabricação de pão de forma, podendo-se interpretar como representante, também, do processo de fabricação de pão de forma integral. Vale ressaltar que o processo de forneamento corresponde, de maneira geral, à aplicação de calor seco ao redor de 200°C por aproximadamente 20 minutos



FIGURA 1: Diagrama da produção de pão de forma

FONTE: Ziglio et al. (2007) - adaptado

3.2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E SEGURANÇA DE ALIMENTOS

No momento da colheita, a maioria dos alimentos apresenta contaminantes, componentes não comestíveis, ou características físicas variáveis (forma, tamanho ou cor). Assim, é necessário submetê-los a uma ou

mais operações de limpeza, classificação e diferentes processos visando redução da carga microbiana. A presença de contaminantes (ou corpos estranhos) em alimentos processados é a principal causa de ações judiciais contra empresas alimentícias (FELLOWS, 2003).

As necessidades diárias de energia e de crescimento devem ser supridas mediante consumo de diversos produtos procedentes do reino animal, vegetal e de minerais. A grande maioria dos produtos procedentes de tecidos vegetais e/ou animais é altamente perecível, e possui uma validade muito curta. O abastecimento regular de alimentos requer seu armazenamento e transporte, operações que demandam certo tempo, durante o qual os alimentos ficam expostos à ação deletéria de todos os tipos que microrganismos que podem alterar suas características. É preciso, então, evitar a ação desses agentes (ORDÓÑEZ, 2005).

A definição de alimentos seguros para consumo depende do entendimento de risco significativo. Para o público, alimentos seguros significam que apresentam risco zero; para um produtor, significam risco aceitável. Devido à quantidade de produtos alimentícios disponíveis, complexidade da cadeia de distribuição e da natureza humana (inerente a cometer erros e diversos estilos de vida) é impraticável atingir o risco zero. O atual perfil dos consumidores, que buscam produtos frescos e minimamente processados, limita o uso de algumas estratégias comuns para redução da carga microbiana, como processamento excessivo e adição de agentes conservantes e químicos (FORSYTHE, 2002).

O desrespeito aos padrões higiênico-sanitários pode levar à contaminação de qualquer alimento por substâncias tóxicas, microrganismos patogênicos e parasitas. As contaminações ocorrem freqüentemente no processo de manipulação, bem como, por conseqüência da má higienização do ambiente e dos utensílios, estocagem inadequada e preparação incorreta (BAÚ, SIQUEIRA e MOOZ, 2009). A qualidade da matéria-prima é, também, de fundamental importância para a obtenção de alimentos de qualidade, uma vez que nas diferentes etapas de seu processamento estas matérias - primas estarão sujeitas ao incremento de sua contaminação.

Franco e Landgraf (2008) afirmam que a microbiota do trigo, centeio e outros cereais utilizados na formulação do pão, é formada pela mesma do solo, do ambiente de armazenamento e a adquirida durante o processamento. As condições para o desenvolvimento microbiano são restritas, pois apesar do alto teor protéico e de carboidratos encontrados nos cereais, a atividade de água é baixa. No caso das farinhas, o uso de agentes branqueadores auxilia na redução da carga microbiana, o que não acontece ao utilizar-se farinha integral. Conseqüentemente, os produtos de panificação, se manuseados de maneira adequada, raramente são afetados pelos microrganismos devido a baixa umidade. Armazenar o produto em condições de umidade elevada ou embalá-lo ainda quente pode levar ao crescimento de fungos filamentosos, popularmente conhecidos como bolores.

De acordo com a RDC n° 12 de 2001, da ANVISA, que estabelece os “Padrões Microbiológicos para Alimentos”, são exigidas para produtos como pães as análises de *Salmonella* spp. e Coliformes Termotolerantes (ou a 45°C – cujos parâmetros são ausência em 25g e máximo de 10² UFC/g de produto, respectivamente (BRASIL, 2001).

3.2.1 *Salmonella* spp.

Segundo Jay (2002), salmonelas são pequenos bastonetes Gram-negativos, não esporulados, que são indistinguíveis de *Escherichia Coli* sob o microscópio ou mesmo em ágar nutriente. São amplamente distribuídas na natureza e tem o homem e outros animais como principais reservatórios. A ingestão de alimentos contaminados causa vômitos, dores abdominais (não tão agudas quanto na intoxicação estafilocócica), dor de cabeça, calafrios e diarreia, geralmente entre 12 e 14 horas. Tais sintomas são acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência, os quais persistem de 2 a 3 dias.

A bactéria em questão, por apresentar capacidade de disseminação no meio ambiente, pode ser isolada de vários locais, ou seja, de inúmeras matérias-primas destinadas para produção de alimentos industrializados. Além disso, *Salmonella* spp. pode ser veiculada pelo próprio homem sem sintomas clínicos - portador assintomático.

O crescimento de *Salmonella* spp. é favorecido em valores de pH em torno de 7,0, sendo considerado que valores superiores a 9,0 e inferiores à 4,0 possuem efeito deletério sobre tais bactérias. Entretanto, surtos de salmonelose envolvendo o consumo de suco de laranja não pasteurizado vêm demonstrar a capacidade de adaptação do microrganismo a condições consideradas como adversas (COOK et al., 1998, CDC, 1999). Ruschel et al. (2001) analisando a qualidade microbiológica de sucos de laranja comercializados em Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil) conseguiu isolar *Salmonella cholerasuis* de uma amostra.

Outra característica da matriz alimentícia considerada como limitante do crescimento microbiano, em especial de salmonelas, é a atividade de água (Aa). Literaturas clássicas consideram como relevantes para o crescimento e desenvolvimento de *Salmonella* spp. valores de atividade de água de no mínimo 0,94 em pH neutro (JAY, 2005). Entretanto, surtos causados por *Salmonella* sp. associados ao consumo de produtos de baixa Aa, tais como pasta de amendoim, pistache, amêndoas, chocolate, cereais e leite em pó, demonstram a capacidade de tolerância do microrganismo a valores baixos de atividade de água (PODOLAK et al., 2010). Além disso, o microrganismo vem sendo isolado de diversas matrizes alimentícias consideradas “inadequadas” à sobrevivência e ao crescimento de salmonelas devido à baixa atividade água: aveia tostada (CDC, 1998), sementes de gergelim e pasta de gergelim (BROCKMANN, PIECHOTOWSKI e KIMMIG, 2004), proteína vegetal hidrolisada comercializada na forma de pó ou pasta (FDA, 2010), pimenta do reino (CASTRO et al., 2011), suplementos protéicos em pó e a base de soro de leite (FDA, 2011), etc.

Registros de surtos de salmonelose associados ao consumo de pães contaminados, bem como o isolamento da bactéria desse tipo de alimentos são escassos, porém existem. No ano 2000, nos Estados Unidos, um grande surto causado por *Salmonella* Thompson, envolvendo os estados do Arizona e a Califórnia, foi associado ao consumo de pães para hambúrgueres contaminados por um manipulador portador do microrganismo (KIMURA, 2005).

Dawson et al. (2007) realizaram diversos experimentos para estudar a transferência de *Salmonella* Typhimurium a partir de superfícies revestidas com carpete, madeira e azulejo, e manutenção da viabilidade em matrizes alimentícias como pão, ressaltando a importância da contaminação cruzada na veiculação de salmonelas a partir de alimentos. Como resultado, foi verificado que *Salmonella* Typhimurium pode sobreviver por até 4 semanas em superfícies secas, e em número suficiente para serem transferidas para os alimentos e contaminá-los com apenas 5 segundos de contato.

Uma tendência mundial é a procura por tratamentos que combatam a contaminação dos alimentos. Polizel (2006) comprovou a eficácia do tratamento por irradiação. A irradiação dos alimentos constitui importante método capaz de diminuir as perdas econômicas provenientes da deterioração e a eliminação de patógenos, aumentando o nível de segurança dos alimentos. Este processo surge como resposta à necessidade de produtos seguros, devido à crescente demanda da população mundial e tem se destacado como técnica promissora entre os recursos atuais disponíveis para a preservação de alimentos.

3.2.2 Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli*

O grupo de bactérias denominado “Coliformes Totais” é composto por bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae. São, portanto, bastonetes Gram-negativos e não esporulados, que possuem como característica em comum a capacidade de fermentação da lactose com produção de gás em 24/48h à temperatura de 35°C. Dentre as mais de 20 espécies classificadas como “coliformes totais” estão aquelas habitantes do trato gastrintestinal do homem e outros animais, bem como aquelas não entéricas. O subgrupo dos “Coliformes Termotolerantes” faz referência aos coliformes capazes de fermentarem, também, a lactose com produção de gás a temperatura de 45°C em 24h. Incluem-se aqui bactérias de origem entérica, bem como aquelas de origem não fecal, fato este que levou à substituição da denominação deste subgrupo: o termo “coliformes termotolerantes” vem sendo adotado em substituição ao termo “coliformes fecais” (SILVA et al., 2010)..

A bactéria *E. coli* pertence ao grupo dos coliformes totais e dos coliformes termotolerantes. Sua análise em alimentos visa estabelecer uma correlação de contaminação dos mesmos com material de origem fecal, uma vez que o habitat da bactéria é exclusivamente o trato gastrintestinal de animais (SILVA et al., 2010).

Assim como salmonelas, coliformes e *E. coli* são bactérias sensíveis aos diversos tratamentos térmicos aplicados na indústria alimentícia, sendo a contaminação cruzada pós-processo um fator importante na manutenção da qualidade microbiológica de pães.

Além disso, a utilização de grãos e farinhas de boa qualidade contribuirá para um produto final com baixos níveis de contaminação microbiana e impedirão, também, a contaminação do ambiente de processo devido à entrada de matérias-primas microbiologicamente contaminadas.

Saddozai e Khalil (2009) analisaram a qualidade microbiológica de produtos de panificação na cidade de Islamabad (Paquistão). Para os pães analisados, não foi verificada a presença de *E. coli*, mas coliformes termotolerantes foram encontrados em contagens variando de <3 até 460 NMP/g de amostra.

3.2.3 Fungos

Os fungos se dividem em 2 grupos de microrganismos: fungos filamentosos (“bolores”) e leveduras; sendo os primeiros pluricelulares e os últimos organismos unicelulares. Estão amplamente distribuídos na natureza, e são encontrados, no solo, na superfície de vegetais, na pele e mucosas de animais, na água e no ar.

Os esporos dos fungos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, crescem rapidamente no solo, em plantas, em alimentos, em papel e até vidros. Alimentos armazenados representam um excelente campo para a proliferação dos fungos, principalmente onde os princípios básicos adequados de secagem e armazenamento ainda são desconhecidos ou desprezados. (FONSECA, 2009).

A microbiota fúngica natural que coexiste com a produção de alimentos é composta principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Muitas espécies de *Fusarium* são patógenos que destroem os cereais e outros produtos e a produção de micotoxinas ocorre antes ou logo após a colheita. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* também são patógenos vegetais ou saprófitas, estes relacionados mais habitualmente com os produtos e com os alimentos durante a secagem e principalmente no período de armazenamento (ICMSF, 1996).

A contaminação fúngica em alimentos representa um perigo à saúde pública, motivo de grande preocupação por parte dos órgãos de vigilância sanitária (TANIWAKI; SILVA, 2001). Quando ocorre a disseminação de fungos nos grãos, ainda no campo ou no armazenamento, os seus derivados, tais como a farinha, carregarão os esporos e/ou os metabólitos fúngicos, como as micotoxinas (MILLER, 1995). Estas ao serem ingeridas, inaladas ou absorvidas pela pele podem causar: estado de letargia, perda de peso, intoxicações, vômitos, câncer e óbito em homens e animais.

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos presentes naturalmente em produtos agrícolas, sendo bastante encontradas em grãos e cereais devido à facilidade de contaminação desses alimentos, que ocorre principalmente por duas vias: por fungos patogênicos que crescem nas plantas, ainda no campo, ou por fungos que crescem durante o armazenamento dos grãos. A detecção de fungos não necessariamente indica a presença de micotoxinas uma vez que nem todos as produzem (SEKIYAMA, 2007). Por outro lado, a ausência de fungos numa matriz alimentícia não pode ser interpretada como ausência de micotoxinas, uma vez que tais moléculas são mais resistentes aos diversos tratamentos utilizados na indústria de alimentos quando comparadas às células do fungo produtor.

O estudo e a pesquisa de micotoxinas em alimentos vêm num crescente desenvolvimento em função, principalmente, de as mesmas hoje representarem um importante fator limitante na produção de grãos e outros alimentos (WHO, 2001).

A citrinina, micotoxina carcinogênica produzida por *Penicillium citrinum*, *Penicillium viridicatum* e alguns outros fungos, tem sido detectada em diversos grãos e cereais que se apresentavam deteriorados por fungos; em especial arroz, trigo, centeio e cevada (FREIRE et al., 2007).

Pacin et al. (1997) avaliaram a presença de deoxinivalenol (DON) em trigo, farinha de trigo, pães e massas amplamente consumidas pela população da Argentina. Verificaram que 93,3% das 120 amostras do trigo estavam contaminadas pela toxina em concentrações que variavam entre 100 e 9.250 µg/Kg. Foi encontrado em todas as 134 amostras de farinha analisadas contaminação por DON (concentração média de 1.309 µg/Kg) e em 92,8% das amostras dos diferentes produtos de panificação apresentando concentrações de até 2.800 µg/Kg e média de 464 µg/Kg.

Segundo Costa (2009), a farinha de trigo integral possui vida de prateleira reduzida por apresentar alta atividade enzimática e presença de bolores e leveduras que dificultam seu armazenamento e conservação. Dentre os métodos usados para prolongamento da vida de prateleira dos pães integrais, a aplicação de radiação gama mostra-se eficiente. Por outro lado, a mesma afeta as características da farinha de trigo integral, modificando suas propriedades tecnológicas. Essa farinha, se utilizada na fabricação de pães integrais, afetaria diretamente a qualidade do mesmo, tornando-o de baixa qualidade. A redução da qualidade da farinha de trigo é proporcional à dose de radiação gama utilizada e ao tempo de armazenamento.

Meirelles e Srebernick (2008) defendem a necessidade de a Legislação incluir análises de bolores e leveduras em produtos que contem cereais. Apesar de sua análise não ser contemplada para produtos como os pães, tais microrganismos estão diretamente associados à qualidade microbiológica da matéria prima e às condições higiênico-sanitárias durante o processamento do alimento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os pães integrais foram obtidos em supermercados da cidade do Rio de Janeiro e foram transportados na própria embalagem até o laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICRALIM) do Departamento de Engenharia Bioquímica – Escola de Química/UFRJ.

Foram analisadas três (3) diferentes marcas de pães de forma tipo integral, a saber: MARCA A – *Light* 100% Integral 12 grãos; MARCA B - *Light* Integral 10 grãos; e MARCA C - *Light* 7 grãos. Para cada uma das marcas, foram coletadas amostras pertencentes a três (3) diferentes lotes, e as amostras de cada lote foram compostas por cinco (5) unidades amostrais. No total, foram avaliadas 45 unidades amostrais de pão de forma integral no período de janeiro a março de 2011.

De cada embalagem eram retirados 50g de pão, 25g destinados para análise de *Salmonella* spp.e 25g para análise de *Escherichia coli* e fungos/aeróbios mesófilos totais.

4.1 ANÁLISE DE COLIFORMES E *Escherichia Coli*

Para contagem de coliformes totais e *E. coli* nas amostras, foram utilizadas placas “3M™ Petrifilm™ para Contagem de *E. coli*/Coliformes”. Para tanto, 25g de pão integral foram homogeneizados com 225 ml de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) e submetidos a diluições: 10^{-2} , 10^{-3} . Foi retirado 1 ml de cada diluição e aplicado sobre a placa Petrifilm™. Em seguida foram incubados a 35°C por até 48h horas (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

4.2 ANÁLISE DE *Salmonella* spp.

A metodologia utilizada para detecção de *Salmonella* spp. seguiu o protocolo preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e publicado no

Bacteriological Analytical Manual (BAM) disponível *online* (ANDREWS e HAMMACK, 2011) com algumas modificações.

A primeira etapa consistiu de pré-enriquecimento em caldo não seletivo: foram homogeneizados 25g de pão em 225 ml de Caldo Lactosado com incubação a 35°C por 24 horas. A etapa seguinte consistiu da transferência de alíquotas desse material para caldos de enriquecimento seletivo: 1 ml do pré-enriquecimento para tubos com 10 ml de Caldo Tetrionato e 1 ml para o Caldo Rappaport-Vassilidis Soja, com incubação a 35°C por 24 horas. A metodologia preconiza transferência de 0,1 ml do caldo de pré-enriquecimento para o Rappaport-Vassilidis Soja; porém optamos por utilizar 1 ml – aumentando, assim, o volume de inóculo, uma vez que caso presente no alimento não se espera um grande número de microrganismo. Pelo mesmo motivo procedeu-se com incubação a 35°C do Caldo Rappaport-Vassilidis Soja, e não à temperatura de 42°C, para que a temperatura ficasse mais próxima da ótima para o crescimento do microrganismo.

Logo após esse período foi feito o plaqueamento seletivo diferencial em placas contendo Ágar Hektoen-Enteric (HE), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Bismuto-Sulfito (BS) com o objetivo de isolar colônias típicas de *Salmonella* spp. O material para esgotamento em HE, XLD e BS foi obtido a partir dos dois caldos seletivos, sendo retirado de cada caldo uma alçada de inóculo e esgotada em cada um dos meios de cultura. As placas foram incubadas a 35°C por 48h para visualização de colônias típicas. Havendo crescimento de colônias típicas proceder-se-ia com a confirmação bioquímica do gênero *Salmonella*.

4.3 ANÁLISE DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS E CONTAGEM DE AERÓBIOS MESÓFILOS TOTAIS

Para realização da contagem de fungos filamentosos e leveduras foram utilizadas placas “3M™ Petrifilm™ para Contagem de Leveduras e Bolores”. 25g de pão integral foram homogeneizados com 225 ml de água peptonada

0,1% (diluição 10^{-1}) e submetidos a diluições: 10^{-2} , 10^{-3} . Foi retirado 1 ml de cada diluição e aplicado sobre a placa Petrifilm™.

Diante dos resultados negativos para a análise de fungos filamentosos e leveduras, a partir do 2º lote resolveu-se proceder com a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos. Para tanto, foram utilizadas placas de Petri de 140mm contendo ágar *Trypticase Soy* (TS) (bioMérieux). Desse modo, foi possível a inoculação de alíquotas de 1ml pela técnica de espalhamento em superfície (*Spread-Plate*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as diferentes análises microbiológicas realizadas nos produtos serão apresentadas na forma de tabelas.

TABELA 1: Resultados das análises microbiológicas para Coliformes Totais, *E. coli* e *Salmonella* spp. em amostras de pães de forma tipo integral da marca A.

AMOSTRA	ANÁLISES		
	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
A ₁₁ *	<10	<10	Ausência em 25g
A ₁₂	<10	<10	Ausência em 25g
A ₁₃	<10	<10	Ausência em 25g
A ₁₄	<10	<10	Ausência em 25g
A ₁₅	<10	<10	Ausência em 25g
A ₂₁	<10	<10	Ausência em 25g
A ₂₂	<10	<10	Ausência em 25g
A ₂₃	<10	<10	Ausência em 25g
A ₂₄	<10	<10	Ausência em 25g
A ₂₅	<10	<10	Ausência em 25g
A ₃₁	<10	<10	Ausência em 25g
A ₃₂	<10	<10	Ausência em 25g
A ₃₃	<10	<10	Ausência em 25g
A ₃₄	<10	<10	Ausência em 25g
A ₃₅	<10	<10	Ausência em 25g

*Os números que acompanham a letra representante de cada marca correspondem ao lote e à unidade amostral, respectivamente, analisada.

TABELA 2: Resultados das análises microbiológicas para Coliformes Totais, *E. coli* e *Salmonella* spp. em amostras de pães de forma tipo integral da marca B.

AMOSTRA	ANÁLISES		
	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
B ₁₁ *	<10	<10	Ausência em 25g
B ₁₂	<10	<10	Ausência em 25g
B ₁₃	<10	<10	Ausência em 25g
B ₁₄	<10	<10	Ausência em 25g
B ₁₅	<10	<10	Ausência em 25g
B ₂₁	<10	<10	Ausência em 25g
B ₂₂	<10	<10	Ausência em 25g
B ₂₃	<10	<10	Ausência em 25g
B ₂₄	<10	<10	Ausência em 25g
B ₂₅	<10	<10	Ausência em 25g
B ₃₁	<10	<10	Ausência em 25g
B ₃₂	<10	<10	Ausência em 25g
B ₃₃	<10	<10	Ausência em 25g

B₃₄	<10	<10	Ausência em 25g
B₃₅	<10	<10	Ausência em 25g

*Os números que acompanham a letra representante de cada marca correspondem ao lote e à unidade amostral, respectivamente, analisada.

TABELA 3: Resultados das análises microbiológicas para Coliformes Totais, *E. coli* e *Salmonella* spp. em amostras de pães de forma tipo integral da marca C.

AMOSTRA	ANÁLISES		
	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
C₁₁	<10	<10	Ausência em 25g
C₁₂	<10	<10	Ausência em 25g
C₁₃	<10	<10	Ausência em 25g
C₁₄	<10	<10	Ausência em 25g
C₁₅	<10	<10	Ausência em 25g
C₂₁	<10	<10	Ausência em 25g
C₂₂	<10	<10	Ausência em 25g
C₂₃	<10	<10	Ausência em 25g
C₂₄	<10	<10	Ausência em 25g
C₂₅	<10	<10	Ausência em 25g
C₃₁	<10	<10	Ausência em 25g
C₃₂	<10	<10	Ausência em 25g
C₃₃	<10	<10	Ausência em 25g
C₃₄	<10	<10	Ausência em 25g
C₃₅	<10	<10	Ausência em 25g

*Os números que acompanham a letra representante de cada marca correspondem ao lote e à unidade amostral, respectivamente, analisada.

Os resultados obtidos na análise de salmonela e coliformes/*E. coli* indicam que todas as 45 amostras encontravam-se dentro do parâmetro microbiológico exigido pela legislação brasileira. *Salmonella* spp. não foi isolada de nenhuma das amostras analisadas, de acordo com a metodologia empregada, bem como coliformes/*E. coli* cujo resultado foi expresso como sendo inferior ao limite de detecção do método empregado para análise.

Semelhantemente, estudo realizado pelo Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC), que analisou seis tipos de pães de forma vendidos em São Paulo, não apontou a presença de microrganismos ou sujeiras que pudessem ser nocivos à saúde. Também foram avaliadas as condições de

armazenamento e a data de validade dos produtos. Como conclusão, todos os itens avaliados estavam de acordo com a legislação (ABRADEC, 2007).

Tais resultados também estão em concordância àqueles obtidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) em análises realizadas em 1997. Dentre as 11 amostras de pães de forma analisadas, pertencentes a diferentes marcas, em nenhuma delas foi verificada a presença de *Salmonella* spp. A análise de coliformes/*E. coli* não foi realizada, uma vez que a legislação vigente à época do estudo estabelecia parâmetros apenas para *Salmonella* sp. (ausência em 25g) e Bolores e Leveduras (máximo de 5×10^3 /g). Para este último parâmetro, apenas uma das amostras estava fora do padrão (INMETRO, 1997).

TABELA 4: Resultado das contagens de fungos filamentosos e leveduras para as amostras de pães das marcas A, B e C.

AMOSTRA	FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS (UFC/g)
A ^{*_{11**}}	<10
A ₁₂	<10
A ₁₃	<10
A ₁₄	<10
A ₁₅	<10
B _{11*}	<10
B ₁₂	<10
B ₁₃	<10

B₁₄	<10
B₁₅	<10
C_{11*}	<10
C₁₂	<10
C₁₃	<10
C₁₄	<10
C₁₅	<10

*Letras maiúsculas diferentes indicam marcas de pães de forma integrais diferentes.

**Os números que acompanham a letra representante de cada marca correspondem ao lote e à unidade amostral, respectivamente, analisada.

TABELA 5 Resultado das contagens de microrganismos aeróbios mesófilos totais para as amostras de pães das marcas A, B e C.

AMOSTRA	AERÓBIOS MESÓFILOS TOTAIS (UFC/g)	AMOSTRA	AERÓBIOS MESÓFILOS TOTAIS (UFC/g)
A*_{21**}	<10	B₃₁	<10
A₂₂	<10	B₃₂	<10
A₂₃	<10	B₃₃	<10
A₂₄	<10	B₃₄	<10
A₂₅	<10	B₃₅	<10
A₃₁	<10	C₂₁	<10
A₃₂	<10	C₂₂	<10
A₃₃	<10	C₂₃	<10
A₃₄	3,1x10 ²	C₂₄	<10
A₃₅	<10	C₂₅	<10
B₂₁	3,7x10 ²	C₃₁	<10
B₂₂	6,8x10 ³	C₃₂	<10
B₂₃	<10	C₃₃	3,7x10 ²
B₂₄	<10	C₃₄	<10

B₂₅	1,4x10 ³	C₃₅	<10
-----------------------	---------------------	-----------------------	-----

*Letras maiúsculas diferentes indicam marcas de pães de forma integrais diferentes.

**Os números que acompanham a letra representante de cada marca correspondem ao lote e à unidade amostral, respectivamente, analisada.

Os pães integrais são compostos por vários grãos de cereais, como trigo, aveia, cevada, arroz, e as vezes até mesmo frutas desidratadas. Todos esses componentes contém fibras, carboidratos, proteínas e vitaminas indispensáveis para a uma alimentação balanceada. Porém, desde a colheita dos grãos, estes já podem apresentar uma considerável carga de microrganismos devido ao contato com água, solo e ar. Durante o processamento as chances de ocorrer contaminação são altas devido à complexidade do processo produtivo.

Os níveis de contaminação por microrganismos aeróbios mesófilos totais encontrados nos pães de forma integrais analisados podem ser considerados dentro do esperado para esse tipo de alimento.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que os pães de forma integrais pertencentes às marcas A, B e C estavam de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); não tendo sido detectada a presença de microrganismos pertencentes ao gênero *Salmonella* e nem aqueles pertencentes ao grupo Coliformes (incluindo *E. coli*).

6 REFERÊNCIAS

ANDREWS, W. H; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration – **Bacteriological analytical Manual Online**. Chapter 5, updated February 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalABacteriologicalAna/UCM070149>. Acesso em: 1 de fevereiro de 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO (ABIP). **Performance do setor de panificação e confeitaria brasileiro em 2010**. Disponível em: http://www.abip.org.br/perfil_internas.aspx?cod=102. Acesso em: 15 de abril de 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE DEFESA DO CONSUMIDOR, MEIO AMBIENTE E CIDADANIA (ABRADEC). Pão tem muito mais gordura do que anuncia. **Revista Consumidor**, ano I, n. II, 2007.

BAÚ, D.; SIQUEIRA M. R.; MOOZ, E. D.; ***Salmonella – Agente Epidemiológico Causador de Infecções Alimentares: Uma Revisão***; XX Congresso Brasileiro de Economia Doméstica, VII Encontro Latino-Americano de Economia Doméstica, I Encontro Internacional de Economia Doméstica – “Família e Economia Doméstica: Reflexões, Perspectivas e Desafios”, Ponta Del Mar, Fortaleza, Ceará, 2009.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RDC n. 12 - Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 02 de janeiro de 2001, Brasília – DF. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01.rdc.htm. Acesso em: 25 de janeiro de 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RDC n. 263 - BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 8, 03 jun. 2005b. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

da Farinha de Trigo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 jun. 2005, Seção 1, n. 105, p. 91.

BROCKMANN, S. O.; PIECHOTOWSKI, I.; KIMMIG, P. *Salmonella* in Sesame Seed Products. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 1, p. 178-180, 2004.

CAFÉ, S. L.; FONSECA, P. S. M.; AMARAL, G. F.; MOTTA, M. S. F. R.; ROQUE, C. A. L.; ORMOND, J. G. P. Cadeia Produtiva do Trigo. **BNDES Setorial**, n. 18, p. 193-220, 2003.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. de; Toxinfecção Alimentar por *Salmonella* spp.; **Revista Inst. Ciência Saúde**, 2006.

CASTRO, M. F. P. M.; REZENDE, A. C. B.; BENATO, E. A.; VALENTINI, S. R. T.; FURLANI, R. P. Z.; TFOUNI, S. A. V. Studies on the Effects of Phosphine on *Salmonella* enteric Serotype Enteritidis in Culture Medium and in Black Pepper (*Piper nigrum*). **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 4, p. 665-671, 2011.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Multistate Outbreak of *Salmonella* Serotype Agona Infections Linked to Toasted Oats Cereal - United States, April-May, 1998. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 47, n. 22, p. 462-464, 1998.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Salmonella* Serotype Muenchen Infections Associated with Unpasteurized Orange Juice -- United States and Canada, June 1999. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 48, n. 27, p. 582-585, 1999.

COOK, K. A.; DOBBS, T. E.; HLADY, W. G.; WELLS, J. G.; BARRETT, T. J.; PUHR, N. D.; LANCETTE, G. A.; BODAGER, D. W.; TOTH, B. L.; GENESE, C. A.; HIGHSMITH, A. K.; PILOT, K. E.; FINELLI, L.; SWERDLOW, D. L. Outbreak of *Salmonella* Serotype Hartford Infections Associated With Unpasteurized Orange Juice. **Journal of American Medical Association (JAMA)**, v. 280, n. 17, p. 1504-1509, 1998.

COSTA, P. F. P. da. **Efeito da Radiação Gama e da Radiação Infravermelha na Vida de Prateleira e nas Características Tecnológicas da Farinha de Trigo Integral e do Pão de Forma Integral**. 2009. 214 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

COULTATE, T. P.; **Alimentos: A Química de Seus Componentes**, Artmed, págs. 134-135, 2004.

DAWSON, P.; HAN, I.; COX, M.; BLACK, C.; SIMMONS, L. Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella* Typhimurium from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 945-953, 2007.

FELLOWS, P. J.; **Food Processing Technology: Principles and Practice, Second Edition**, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, pág. 83, 2000.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração de alimentos**. Disponível em: www.micotoxinas.com.br. Acesso em 12 de novembro de 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Nutrition Express Voluntarily Recalls Protein Supplements Because Of Possible Health Risk. **Recall - Firm Press Release**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm248977.htm>. Acesso em: 15 de abril de 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Salmonella* Tennessee Identified in a Processed Food Ingredient. **FDA News Release**. Disponível em: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm203067.htm>. Acesso em: 15 de abril de 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**, Artmed, pág. 11, 2002.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M.; **Microbiologia dos Alimentos**, Editora Atheneu, p.. 106 - 108, 2008.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Documentos**, 110. Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, Ceará, 2010, 48 p., 200

HAAS, P.; ANTON, A.; FRANCISCO, A. de; Cancer Colo Retal no Brasil: Consumo de Grãos Integrais Como Prevenção; **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 39 (3), 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Programa de Análise de Produtos – Pão de forma ou para sanduíche**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/paoforma.asp>. Acesso em: 19 de abril de 2011.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. (ICMSF). **Microrganismos de los alimentos**: características de los patógenos microbiano. Zaragoza: Acríbia, 1996, p.403-428.

JAY, J. M.; **Microbiologia dos Alimentos**, 6ª Edição, Artmed, págs. 416-418, 2005.

KAISERMANN, A. E. C.; **Pão, Alimento do Corpo e da Alma**, Escola do Pão e Gastronomia Ltda., págs. 14-15, 2009.

KIMURA, A. C.; PALUMBO, M. S.; MEYERS, H.; ABBOTT, S.; RODRIGUEZ, R.; WERNER, S. B. A multi-state outbreak of *Salmonella* serotype Thompson infection from commercially distributed bread contaminated by an ill food handler. **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 5, p. 823-828, 2005.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F. P., ITO, K.

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.

4ª. Ed. Washington, D. C., 2001, cap. 8, p. 69 - 82.

LEITE, F. Falta de padrão coloca em xeque pão integral. **O Estado de São Paulo - Vida**, São Paulo 12 de setembro de 2010. Disponível em: http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100912/not_imp608670,0.php.

Acesso em: 20 de abril de 2011.

MACEDO, D. C. de; TEIXEIRA, E. M. B.; JERÔNIMO, M.; BARBOSA, O. A.; OLIVEIRA, M. R. M. de; A Construção da Política de Segurança Alimentar e Nutricional no Brasil, **Revista Simbio-logias**, v.2, n.1, 2009.

MEIRELES, F.; SREBERNICH, S. M.; **Barra de Cereal Diet – Controle Microbiológico da Melhores Formulações Obtidas Através da Metodologia de Superfície de Resposta**; Anais do XII Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas, 2008.

MILLER, J.D. - Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **J. Stored Prod. Res.**, v.1, p.1-16, 1995.

ORDÓÑEZ, J. A.; COLABORADORES; **Tecnologia de Alimentos – Componentes dos Alimentos e Processos** – Vol.1, Artmed, págs. 17, 2005.

PACIN, M. A.; RESNIK, L. S.; NEIRA, S. M.; MOLTÓ, G; MARTÍNEZ, E. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and bakery products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, London, v.14, p.327-331, 1997.

PODOLAK, r.; ENACHE, E.; STONE, W.; BLACK, D. G.; ELLIOTT, P. H. Sources and Risk Factors for Contamination, Survival, Persistence, and Heat Resistance of Salmonella in Low-Moisture Foods. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 10, p. 1919-1936, 2010.

POLIZEL, G. G.; **O Uso da Radiação no Controle Microbiológico dos Alimentos de Origem Animal**; São Paulo, 2006.

RUSCHEL, C. K.; CARVALHO, H. H.; SOUZA, R. B.; TONDO, E. C. Qualidade Microbiológica e físico-química de sucos de laranja comercializados nas vias públicas de Porto Alegre/RS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 94-97, 2001.

SADDOZAI, A. A.; KHALIL, S. Microbiological Status of Bakery Products Available in Islamabad. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, vol. 22, n. 1/2, p. 93-96, 2009.

SEKIYAMA, B. L.; FERRARI, G.; JUNIOR, M. M.; Processos de Descontaminação de Rações Contendo Micotoxinas, **Revista Analytica**, n. 26, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. Contagem de coliformes totais, Coliformes Termotolerantes e Escherichia coli. In: SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 4ª Ed., 2010, São Paulo: Livraria Varela, cap. 9, p. 133-152.

TANIWAKA, M.H.; SILVA, N. Artigo: Fungos em alimentos. Ocorrência e Detecção. Campinas: ITAL , Núcleo de microbiologia, v.1, p.82, 2001.

WORLD HEALTH INTERNATIONAL ORGANIZATION (WHO). FAO Food and Nutrition Paper. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Prepared by the Fifty Sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva World Health Organization, 2001, 701 p.

ZIGLIO, B. R.; BEZERRA, J. R. M. V.; BRANCO, I. G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaboração de Pães com Adição de Farinha de Sabugo de Milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, vol. 9, n. 1, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 – Composição dos diferentes meios de cultura utilizados para realização do presente trabalho.

ÁGUA PEPTONADA (0,1%)

Peptona	1,0g
Água Destilada	1000,0ml

CALDO LACTOSADO

Extrato de carne	3,0g
Peptona bacteriológica	5,0g
Lactose	5,0g

pH: 6,9 ± 0,2 (25°C)

CALDO TETRATIONATO

Proteose peptona	5,0g
Sais biliares	1,0g
Tiosulfato de sódio	30,0g
Carbonato de cálcio	10,0g

pH: 7,6 ± 0,2 (25°C)

CALDO RAPPAPORT-VASSILIADIS SOJA

Peptona de soja	4,5g
Cloreto de sódio	9,0g
Fosfato dipotássico	0,03g
Cloreto de magnésio anidro	13,5g
Fosfato dihidrogênio potássio	1,45g
Verde de malaquita	0,036g

pH: 5,2 ± 0,2 (25°C)

ÁGAR TRIPTICASE DE SOJA

Digestão Pancreática de Caseína	15,0g
Digestão Papáica de Farinha de Soja	5,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Ágar	15g

pH: 7,3 ± 0,2 (25°C)

ÁGAR XILOSE LISINA DESOCICOLATO (XLD)

Extrato de levedura	3,0g
L-lisina	5,0g
Xilose	3,75g
Lactose	7,5g
Sacarose	7,5g
Desoxicolato de sódio	2,5g
Citrato férrico amoniacal	0,8g
Tiosulfato de sódio	5,0g
Vermelho de fenol (40 mL solução 0,2%)	0,08g
Ágar	15g

pH: 7,4 ± 0,2 (25°C)

ÁGAR HEKTOEN-ENTERIC (HE)

Proteose peptona	12,0g
Extrato de levedura	3,0g
Sais biliares	9,0g
Lactose	12,0g
Sacarose	12,0g
Salicina	2,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Tiosulfato de sódio	5,0g
Citrato férrico amoniacal	1,5g
Azul de bromotimol (32,5 mL da solução 0,2%)	0,65g
Fucsina ácida	0,1g
Ágar	14,0g

pH: 7,7 ± 0,2 (25°C)

ÁGAR BISMUTO SULFITO (BS)

Peptonas Bacteriológicas	10,0g
Bismuto sulfito	8,0g
Extrato de carne	5,0g
Dextrose	5,0g
Fosfato dissódico	4,0g
Sulfato ferroso	0,3g
Verde Brilhante	0,025g
Ágar	20,0g

pH: 7,6 ± 0,2 (25°C)

ANEXO 2 – Composição dos pães de forma, para cada uma das marcas, analisados no presente trabalho.

PÃO DE FORMA LIGHT 12 GRÃOS INTEGRAL – MARCA A

Farinha de trigo integral, glúten, semente de girassol, grão de trigo, grão de centeio, gritz de milho, flocos de aveia, farinha de centeio, farinha de linhaça, sal, semente de linhaça, flocos de centeio, gergelim, grão de quinoa, gritz de soja, grão de cevada, grão de milheto, grão de triticales, conservador propionato de cálcio, emulsificantes estearoil-2-lactil lactato de cálcio e goma guar, acidulante ácido láctico, edulcorante sucralose.

PÃO DE FORMA LIGHT 10 GRÃOS INTEGRAL – MARCA B

Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, glúten, grão de trigo, flocos de centeio, gritz de milho, farinha integral de centeio, fermento biológico, sal, fibra de trigo, amido modificado, farinha de cevada, flocos de aveia, linhaça, gritz de soja, farinha de malte, semente de girassol, extrato de malte, quinoa, gergelim, farinha de malte torrada e conservador propionato de cálcio.

PÃO DE FORMA LIGHT 7 GRÃOS – MARCA C

Farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico, farelo de trigo, fermento biológico, glúten, linhaça, gordura vegetal, sal, gergelim, gritz de soja, aveia laminada, centeio, girassol, sucralose e conservador propionato de cálcio.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Fotos de alguns dos resultados obtidos nas diferentes análises microbiológicas realizadas

FOTO 1: Resultados da análise de *Salmonella* spp. para uma unidade amostral de pães de forma integrais das marcas A, B e C (conforme indicado na própria figura). As siglas HE, XLD e BS referem-se às placas contendo os respectivos meios de cultura.

FOTO 2: Resultados da análise para contagem de Coliformes e *E. coli* utilizando-se placas “3M™ Petrifilm™ para Contagem de *E. coli*/Coliformes” - para uma unidade amostral de pães de forma integrais das marcas A, B e C (conforme indicado na própria figura).

FOTO 3: Resultados da análise para contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras utilizando-se placas “3M™ Petrifilm™ para contagem de Leveduras e Bolores” - para uma unidade amostral de pães de forma integrais das marcas A, B e C (conforme indicado na própria figura).

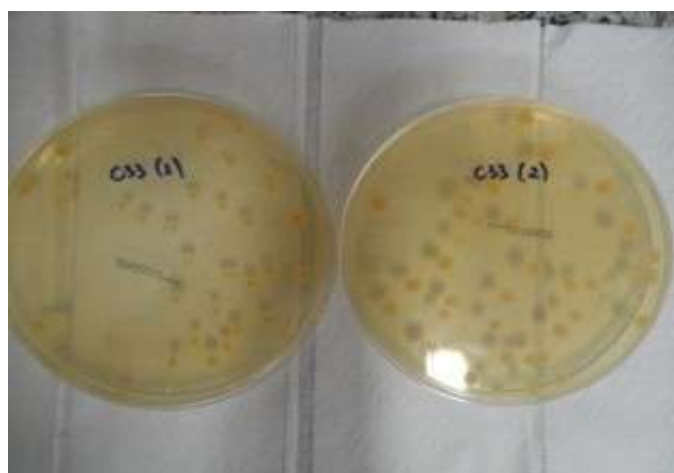


FOTO 4: Resultado da análise para contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos Totais em uma unidade amostral, do terceiro lote, de pão de forma integral da marca C.